

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
20 décembre 2001 (20.12.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 01/96354 A1

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
C07H 19/044,  
19/052, 19/056, 19/06, 19/16, 21/00, C12Q 1/68, G01N  
33/53, A61K 31/7052, A61P 31/12, 35/00

(74) Mandataires : MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Reginbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR01/01830

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Date de dépôt international : 13 juin 2001 (13.06.2001)

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(25) Langue de dépôt : français

Publiée :  
— avec rapport de recherche internationale

(26) Langue de publication : français

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

(30) Données relatives à la priorité :  
00/07557 14 juin 2000 (14.06.2000) FR

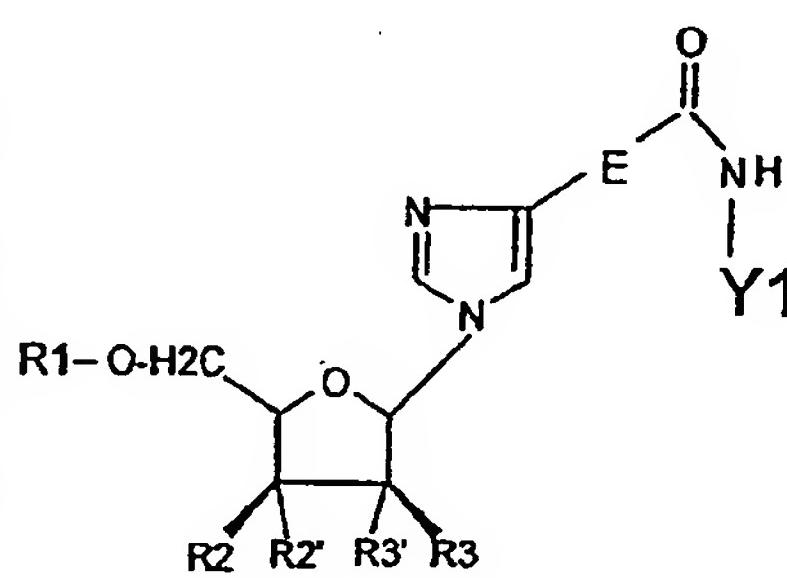
(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) : INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur Roux, F-75015 Paris (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : MARLIERE, Philippe [FR/FR]; 2, Allée Saint Martin, F-91450 Etiolles (FR). POCHET, Sylvie [FR/FR]; 5, rue Gossec, F-75724 Paris 12 (FR).

(54) Title: COMBINATORIAL PRODUCTION OF NUCLEOTIDE AND NUCLEOSIDE (XITP) ANALOGUES

(54) Titre : PRODUCTION COMBINATOIRE D'ANALOGUES DE NUCLEOTIDES ET NUCLEOSIDES(XITP)



(57) Abstract: The invention concerns novel nucleotide analogues comprising a reactive hydrazide function used as initial synthons for preparing compounds (formula I) capable of inducing mutations or capable of inhibiting a DNA polymerase or a kinase. The invention also concerns nucleic acids comprising said nucleotide and nucleoside analogues. Among such compounds, can be cited in particular the compound of formula (I).

(57) Abrégé : La présente invention concerne de nouveaux analogues de nucléotides comportant une fonction réactive hydrazide servant de synthons de départ pour la préparation de composés (formule I) pouvant induire des mutations ou étant capables

d'inhiber une ADN polymérase ou une kinase. L'invention se rapporte également aux acides nucléiques comportant lesdits analogues de nucléosides et nucléotides. Parmi de tels composés, on peut citer notamment le composé de formule (I).

## PRODUCTION COMBINATOIRE D'ANALOGUES DE NUCLEOTIDES ET NUCLEOSIDES (XiTP)

5 La présente invention concerne de nouveaux analogues de nucléotides comportant une fonction réactive hydrazide (formule II) servant de synthons de départ pour la préparation de composés (formule I) pouvant induire des mutations ou étant capables d'inhiber une ADN polymérase ou une kinase. L'invention se rapporte également aux acides nucléiques comportant lesdits analogues de nucléosides et nucléotides.

10

Les inhibiteurs nucléotidiques actuellement disponibles (acyclovir, gancyclovir, AZT, ddC, d4T, 3TC.) présentent des effets secondaires indésirables lors de traitement de longue durée et d'administrations répétées. D'une part, la toxicité intrinsèque de ces analogues de nucléotides provient notamment du fait qu'ils peuvent manquer de spécificité vis-à-vis d'une polymérase ou d'une réverse transcriptase donnée. D'autre part, au bout d'un certain temps, les virus deviennent résistants à ces inhibiteurs même si on augmente les doses.

La synthèse de nouveaux inhibiteurs nucléotidiques représente un enjeu important pour 20 renouveler les méthodes de traitements des infections virales telles que le HIV, CMV et le HSV. Hutchinson, 1990 montre qu'il existe de nombreuses difficultés liées à la synthèse de vastes collections de nucléotides modifiés. Par exemple, il apparaît nécessaire de protéger les fonctions réactives des bases ou des riboses avec toute addition ou modification de groupes.

25

L'invention permet de pallier ces difficultés grâce à un synthon de base permettant l'obtention en une seule étape d'une librairie d'analogues de nucléotides ou de nucléosides. Grâce à ces librairies, on peut par exemple cibler des inhibiteurs hautement spécifiques de la réverse transcriptase du HIV.

30

La préparation de nouveaux nucléotides aux appariements ambigus, c'est-à-dire capables de s'incorporer au brin amorce en réponse à plus d'une parmi les quatre bases

A, C, G, T dans le brin matrice, s'impose également pour perfectionner les procédés de mutagénèse (Sala et al., 1996; Zaccolo et al., 1996; Pochet et al., 1997). L'agent mutagène ultime consisterait en un monomère de l'ADN qui puisse s'apparier aux quatre bases canoniques au stade de l'incorporation comme triphosphate, puis lors de 5 sa copie comme matrice. Le désoxynucléoside triphosphate d'une telle base ambiguë permettrait de substituer toute base canonique par n'importe laquelle des trois autres bases lors de la réPLICATION par une ADN polymérase. En outre, un procédé d'hypermutagénèse *in vivo* via l'incorporation de la base ambiguë simplifierait et accélérerait les protocoles d'évolution dirigée des gènes portés par des plasmides, en 10 évitant le recours aux manipulations coûteuses de la PCR erronée. Un résumé justifiant l'emploi de bases ambiguës dans d'autres applications se trouve dans les références Bergstrom et al., 1995; Loakes et al., 1995; Hill et al., 1998.

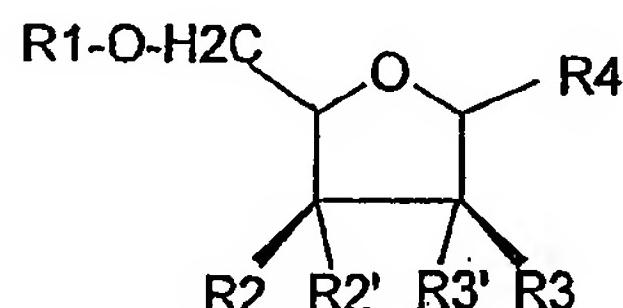
En outre, la découverte de structures chimiques simplifiées mais douées des mêmes 15 capacités d'appariement univoque que chacune des quatre bases de l'ADN, en d'autres termes des ersatz de A, C, G, T, rend possible la préparation de nouvelles sondes ou amorces nucléiques qui peuvent être utilisées dans diverses techniques d'amplification et de détection d'acides nucléiques cibles.

Par ailleurs, sur le synthon de départ de formule II (voir ci-après), il est possible de 20 greffer des molécules réactives se situant par exemple dans la famille des acides aminés, ce qui permet donc de fonctionnaliser l'ADN.

Des désoxynucléosides portant une purine simplifiée en un simple noyau imidazole différemment substitué aux positions 4 et 5 ont été décrits dans Pochet et al., 1998. Ces 25 nucléosides sont intrinsèquement capables de former des liaisons hydrogène avec les quatre bases canoniques par rotation autour de la liaison glycosidique (conformations *syn* et *anti*) et de la liaison carboxamide ("A-like" et "G-like") (Pochet et al., 1995; Pochet et al., 1998). L'incorporation par les ADN polymérasées de ces nucléosides (LeBec et al., 1997) et les effets mutagènes de leurs appariements sont décrits dans 30 Sala et al., 1996; Pochet et al., 1997.

Dans le cadre de la présente invention, des groupements latéraux variables peuvent être greffés au monomère de l'ADN simplifié, désigné ci-après par  $X_0$ , via un groupe carbohydrazide. Ce synthon de départ permet de préparer de multiples substrats des ADN polymérasées en une étape. Le groupe carbohydrazide constitue une fonction très réactive capable de se condenser avec tout aldéhyde ou cétone. Autant de dérivés hydrazones, ci-après désignés par  $X_1$ , peuvent donc être formés à partir de  $X_0$ . Autant de dérivés hydrazines, ci-après désignés par  $X_2$ , peuvent être obtenus par réduction de  $X_1$ .

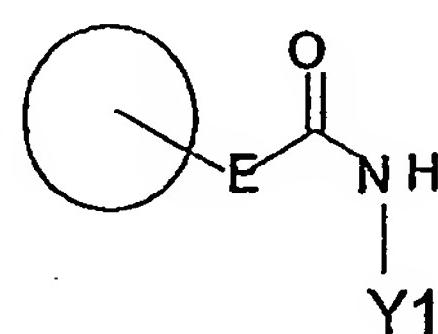
10 Ainsi, la présente invention porte sur des composés de formule générale I :



dans laquelle :

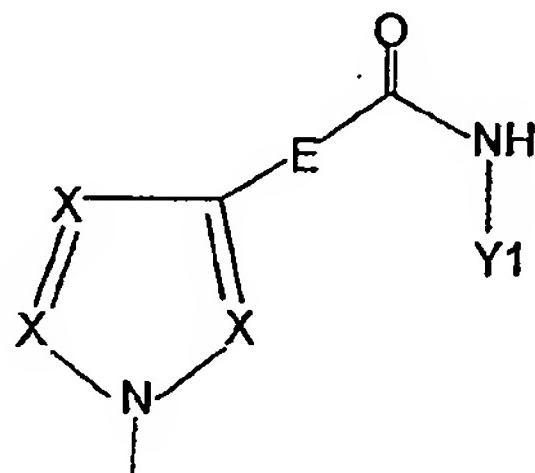
- le groupe R1 représente un hydrogène ou un groupe choisi parmi les groupes phosphate, diphosphate ou triphosphate et les groupes protecteurs tels que DMT.
- 15 - R2 et R2' sont choisis indépendamment l'un de l'autre parmi H, OH, le phosphoramidite et ses dérivés, le H-phosphonate et un terminateur d'elongation T,
- R3 et R3' sont choisis indépendamment l'un de l'autre parmi H, OH, les halogènes (F, Br, Cl, I), un groupe alkyle linéaire ou ramifié comportant 1 à 6 atomes de carbone et un groupe O-R5, R5 représentant un groupe alkyle linéaire ou ramifié comportant 1 à 6 atomes de carbone,
- 20 - R4 représente un hétérocycle (symbolisé par un cercle) substitué, de formule

25



dans lesquelles E désigne un bras espaceur constitué par une chaîne carbonée de 0 à 20 atomes de carbones saturée ou non, comprenant ou non des hétéroatomes et/ou éventuellement substitué ; ledit hétérocycle étant sélectionné parmi :

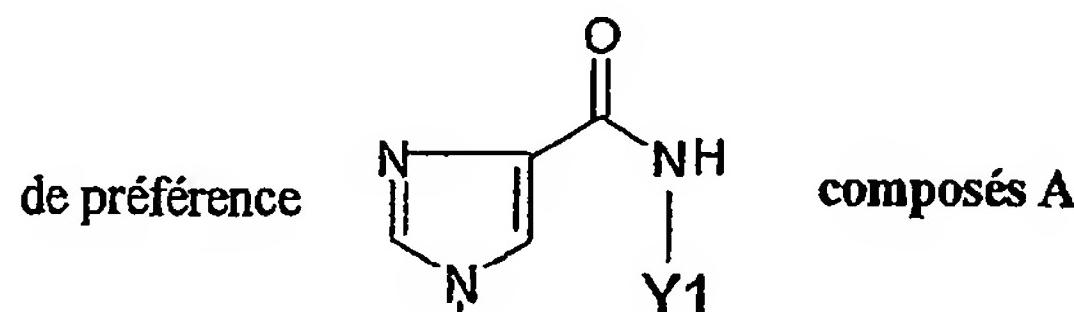
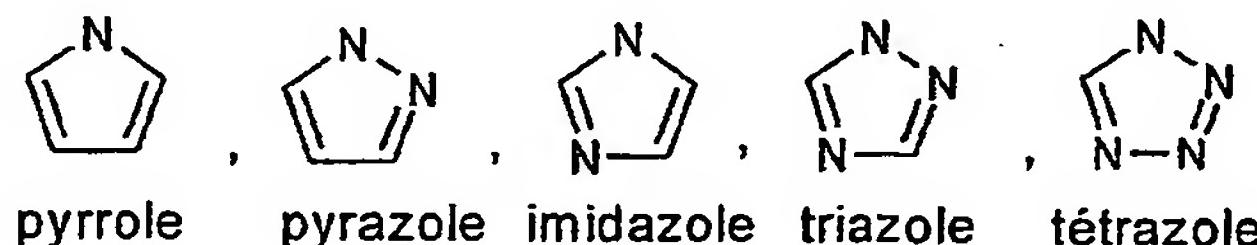
a) les hétérocycles à 5 atomes de la formule :



5

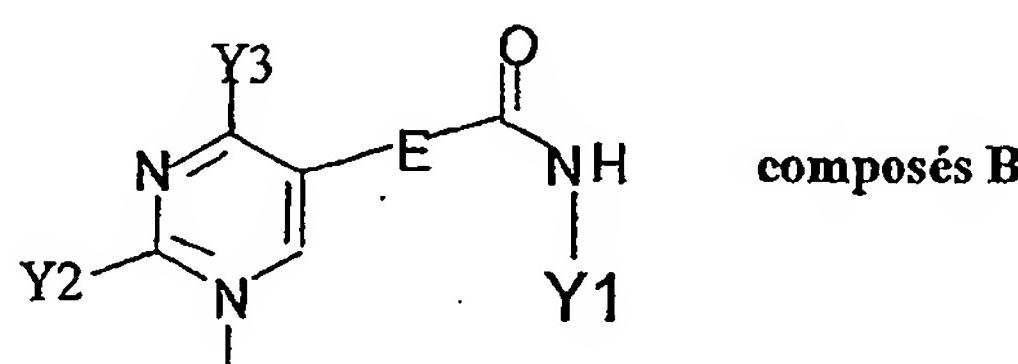
dans laquelle X représente indépendamment les un des autres un groupe CH, C-R6, ou N, R6 étant choisi parmi les halogènes (F, Br, Cl, I), un groupe alkyle linéaire ou ramifié comportant 1 à 6 atomes de carbone et un groupe O-R7 ou S-R7, R7 représentant un hydrogène ou un groupe alkyle linéaire ou ramifié comportant 1 à 6 atomes de carbone,

lesdits hétérocycles appartenant notamment à la famille des azoles, tels que les cycles



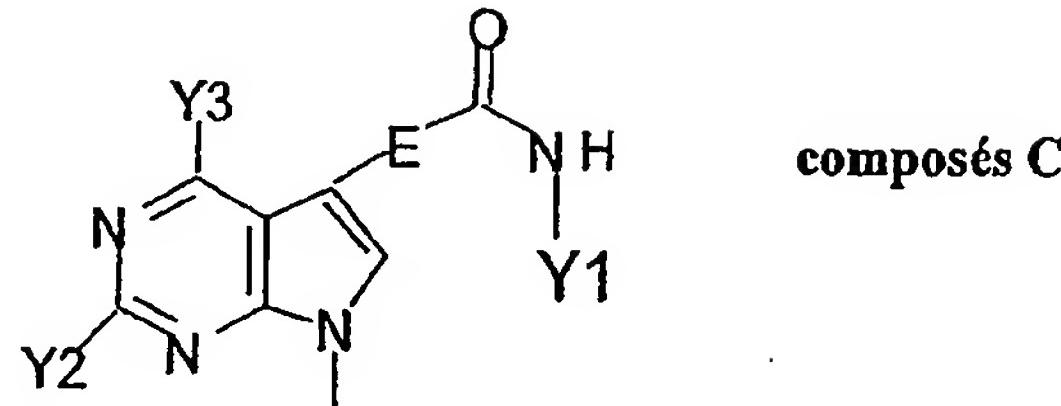
b) les cycles à 6 atomes, notamment les pyrimidines de formule :

15



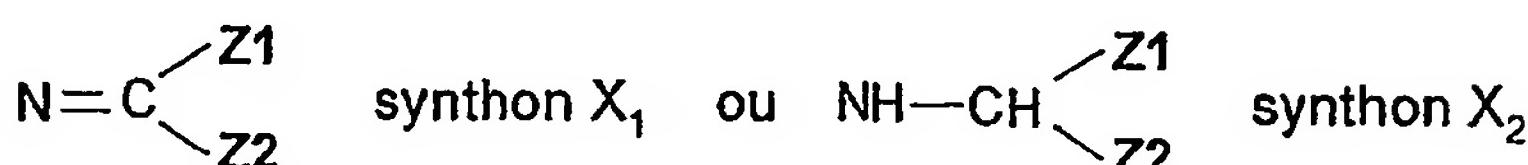
c) les analogues de purines de formule :

5



dans lesquels :

- 10 - Y1 représente NH<sub>2</sub> (désigné par le synthon X<sub>0</sub>) ou un groupe :



- Y2 et Y3 sont choisis indépendamment l'un de l'autre parmi H, OH, O, NH<sub>2</sub>, les halogènes (F, Br, Cl, I), SCH<sub>3</sub>, SH, une amine, un amide (dans le sens -NH-CO-R) ou un alkyle linéaire (sens -OR) ou ramifié comportant 1 à 6 atomes de carbone,
- 15 Z1 et Z2 étant choisis indépendamment l'un de l'autre parmi H et un groupe organique.

Concernant les termes « purines » et « pyrimidines », on se référera à la définition donnée dans Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Oxford Press, 1997. Des exemples de voies de synthèse de ces composés sont décrits aux pages 546 et 547 de ce document.

Concernant les composés B, l'exemple de synthèse présenté à la figure 2 est valable pour les nucléosides en série ribo, desoxy et pour les dérivés phosphorylés. Lorsque X est CONHNH<sub>2</sub>, on obtient un synthon X<sub>0</sub> selon l'invention comprenant un bras espaceur CH=CHCONH(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, où n=6 dans cet exemple.

Parmi les synthons X<sub>0</sub>, X<sub>1</sub> et X<sub>2</sub>, l'invention vise notamment des analogues de nucléosides et des analogues de nucléotides triphosphates que l'on désignera par X<sub>0</sub>TP, X<sub>1</sub>TP et X<sub>2</sub>TP. Les analogues de nucléotides selon l'invention seront de préférence utilisés lorsque l'objectif implique leur incorporation dans un acide nucléique. On

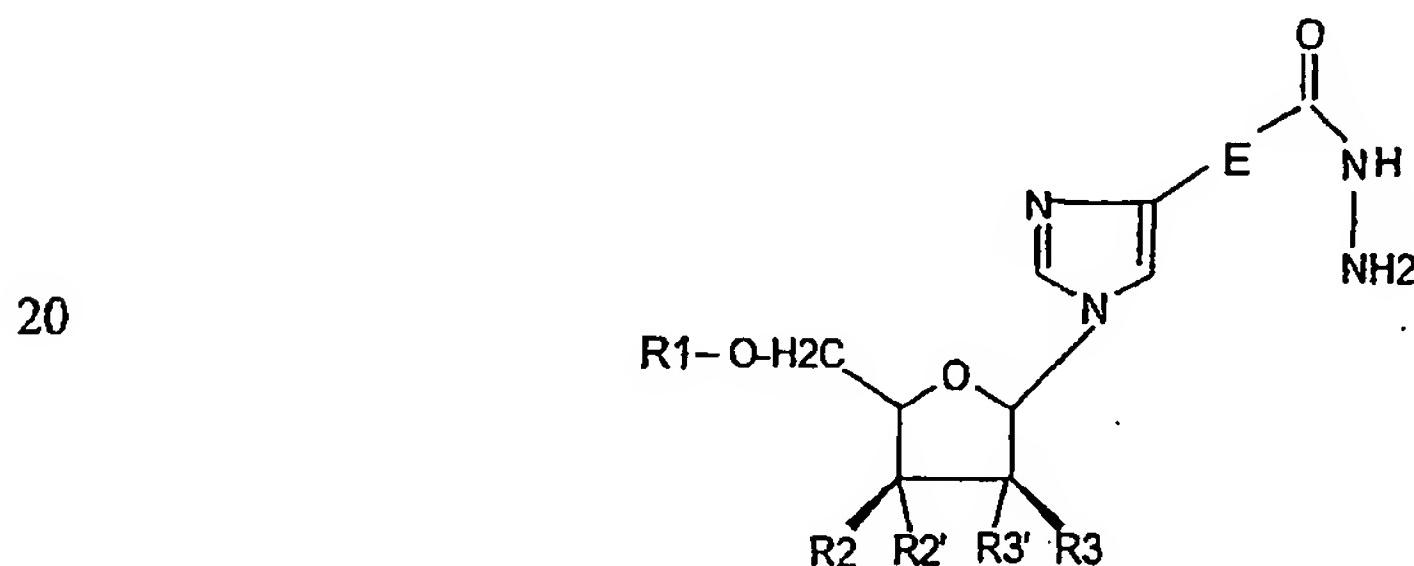
utilisera de préférence un analogue de nucléoside selon l'invention pour inhiber une polymérase *in situ* dans une cellule, notamment pour la fabrication d'un médicament.

Dans les composés de formule I, le groupe R1 représente de préférence un groupe 5 triphosphate ou un hydrogène en fonction de l'objectif évoqué ci-dessus.

De même selon l'objectif recherché, au moins un des groupes R2 et R2' peut représenter un groupe OH, ce qui permet la poursuite de l'elongation par une polymérase ou un groupe terminateur T dans le cas où on souhaite obtenir des inhibiteurs des polymérases. Ainsi, au moins un des groupes R2 et R2' peut représenter

10 le groupe T, qui est sélectionné de préférence parmi F, Br, Cl, I, N<sub>3</sub>, et un groupe alkyle linéaire ou ramifié comportant 1 à 6 atomes de carbone. Bien entendu, tout groupe équivalent fonctionnant comme un terminateur d'elongation est visé pour la préparation de composé inhibant les réverses transcriptases de rétrovirus.

15 Avantageusement, lorsque Y1 est NH<sub>2</sub>, l'invention a pour objet les synthons de départ de formule générale II (synthon X<sub>0</sub>) :

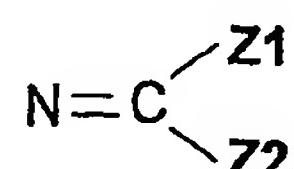


dans lesquels R1, R2, R2', R3, R3' et E correspondent aux groupes de la formule I.

25 Parmi de tels composés, l'invention vise notamment le composé appelé dX<sub>0</sub>TP dans lequel R1 est un groupe triphosphate, et R3 et R3' représentent H,

Les composés de formule II explicités ci-dessus peuvent être utilisés comme synthon de départ pour la préparation de librairie d'analogues de nucléotides et/ou de 30 nucléosides. Leur groupe carbohydrazide permet en effet de conjuguer en une seule étape ces composés avec toute molécule comportant une fonction aldéhyde ou cétone donnant les synthons X<sub>1</sub> après condensation ou X<sub>2</sub> après réduction.

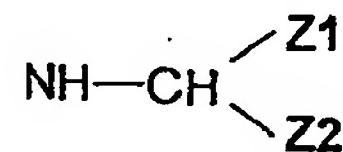
Par condensation des composés de formule II (synthons  $X_0$  et  $X_0\text{TP}$ ) avec toute molécule comportant une fonction aldéhyde ou cétone, on obtient un composé de formule I dans lequel le groupe Y1 représente la formule générale :



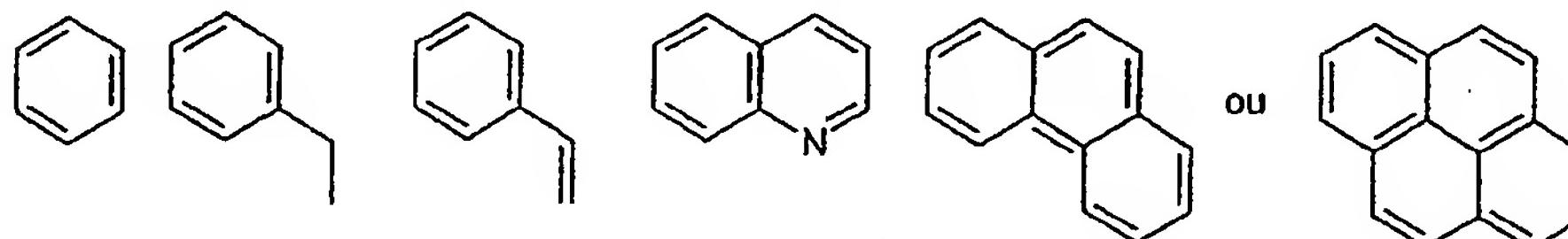
5

Z1 et Z2 représentant indépendamment l'un de l'autre un hydrogène ou un groupe organique. Ces composés seront désignés par  $X_1\text{TP}$  (analogues de nucléotide triphosphate) ou  $X_1$  (analogues de nucléosides).

On peut réduire de tels composés et obtenir les composés de formule I (synthons  $X_2$  et 10  $X_2\text{TP}$ ) dans lequel le groupe Y1 représente la formule générale :



On peut citer par exemple, les composés dans lesquels au moins un des groupes Z1 et Z2 est sélectionné parmi les groupes aromatiques, notamment parmi les groupes de formule :



15

Au moins un des groupes Z1 et Z2 peut également être sélectionné parmi les groupes thiol, alkyle, carbonyle, amine, alcool, aryle, et acide aminé.

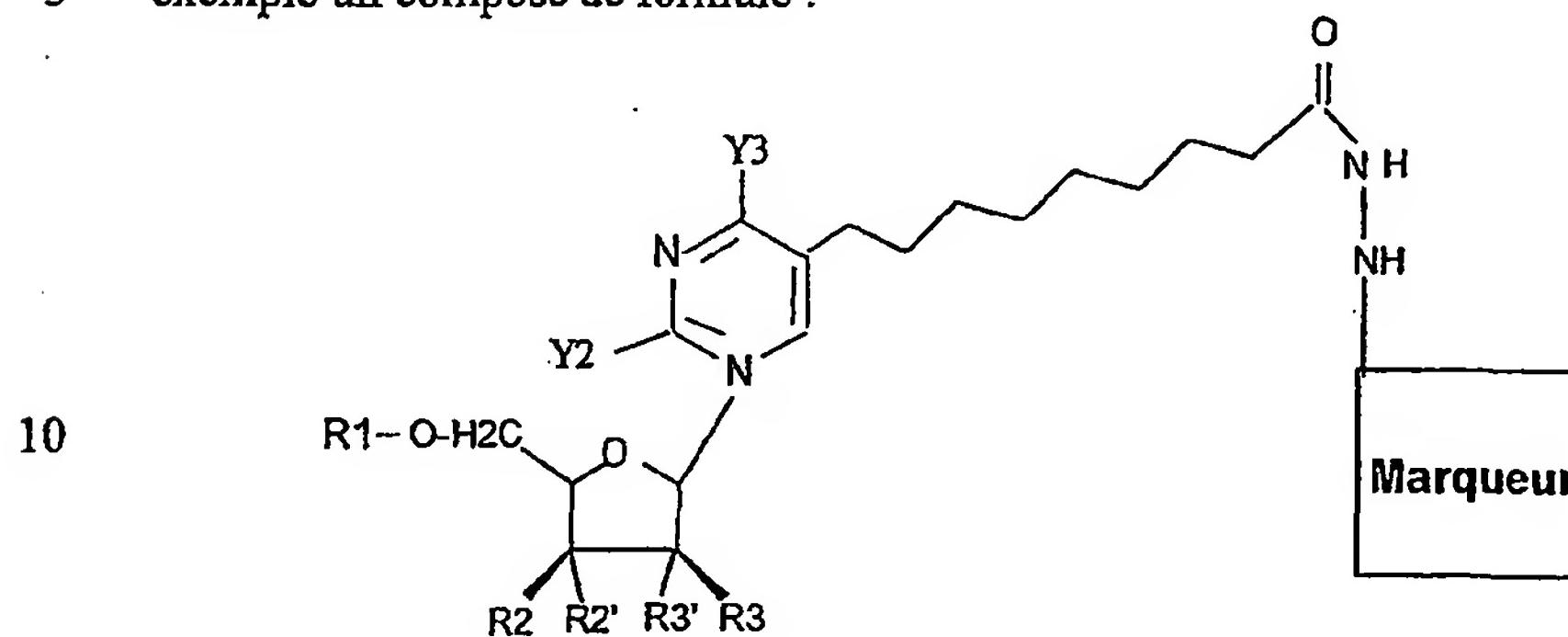
Dans un autre aspect, les composés de l'invention peuvent être caractérisés en ce que 20 Z1 ou Z2 forme un cycle avec Y3.

Dans un mode particulier de réalisation, l'invention concerne les composés précités dans lesquels Z1 ou Z2 comprend un marqueur fluorescent ou phosphorescent, notamment la fluorescamine ou la fluorescéine. Par exemple, on peut faire réagir la

fluorescamine pour marquer le composé ou bien pour détecter sa présence au sein d'un acide nucléique.

On peut donc préparer des composés avec un bras espaceur et un marqueur, par

5 exemple un composé de formule :



Avantageusement, les composés précités sont des substrats d'une polymérase et

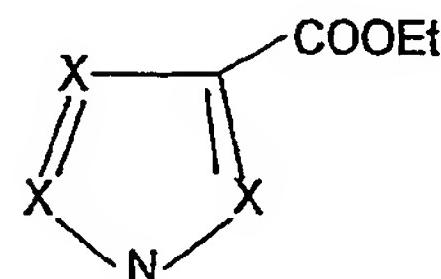
15 peuvent former des appariements avec les bases naturelles, d'une réverse transcriptase et/ou d'une nucléotide kinase.

De plus, lesdits composés peuvent introduire des mutations dans un acide nucléique ou bloquer la synthèse d'ADN ou d'ARN, notamment par les ADN polymérasées, les réverses transcriptases de rétrovirus et les kinases. Parmi les kinases, on entend 20 désigner toute kinase capable de phosphoryler les nucléotides mono ou di-phosphate *in vivo* ou *in vitro*. On peut citer plus particulièrement les désoxycytidine kinases, notamment la DCK2 humaine décrite dans US 5,914,258, les désoxyguanosine kinases et les thymidine kinases.

25 Ainsi, on peut utiliser un composé selon l'invention dans lequel Y1 est NH<sub>2</sub> comme synthon de départ pour la préparation de librairies d'analogues de nucléotides et/ou de nucléosides, et identifier parmi lesdits analogues ceux qui peuvent induire des mutations et/ou bloquer la synthèse d'ADN ou d'ARN.

30 L'invention se rapporte également à un procédé de préparation de composés de formule générale II décrits précédemment caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

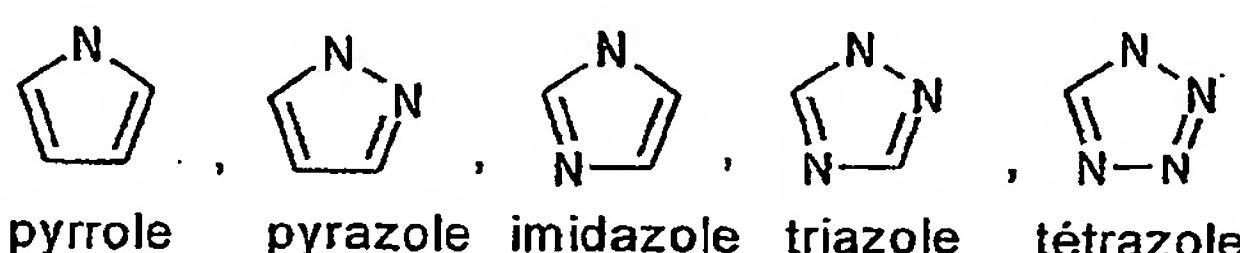
- a) préparation du nucléoside ayant pour hétérocycle un hétérocycle à 5 atomes de formule :



dans laquelle X représente indépendamment les un des autres un groupe CH, C-R6, ou

- 5 N, R6 étant choisi parmi les halogènes (F, Br, Cl, I), un groupe alkyle linéaire ou ramifié comportant 1 à 6 atomes de carbone et un groupe O-R7 ou S-R7, R7 représentant un hydrogène ou un groupe alkyle linéaire ou ramifié comportant 1 à 6 atomes de carbone,

lesdits hétérocycles appartenant notamment à la famille des azoles, tels que les cycles



10

- b) protection de l'alcool en 5' et transformation de la fonction ester éthylique en fonction carbohydrazide par l'action de l'hydrazine,

- c) protection de la fonction amine du groupe carbohydrazide par un groupe protecteur tel que le groupe benzyloxycarbonyle, acétylation de l'alcool en 3',

- 15 d) phosphorylation après déprotection de l'alcool en 5',

- e) et hydrogénolyse du groupe benzyloxycarbonyle.

De préférence, l'étape a) est réalisée au moyen d'une N-transdésoxyribosylase dans le cas de désoxyribose et l'étape d) consiste en la phosphorylation du nucléoside par le

- 20 cyanoéthyl-phosphate en présence de dicyclohexylcarbodiimide; libération concomitante en milieu basique de l'alcool 3' et du groupe cyanoéthyle du 5' phosphate ; puis condensation de pyrophosphate au 5' phosphate activé sous forme de morpholidate.

A partir des composés de formules générales II, on peut préparer un composé de formule générale I décrit ci-dessus par condensation d'un composé de formule générale II avec un aldéhyde ou une cétone, suivi éventuellement d'une réduction.

Il est possible de faire réagir un ou plusieurs composé(s) de formule générale II avec 5 une librairie d'aldéhydes et/ou de cétones, suivie éventuellement d'une réduction, de sorte à obtenir une librairie de composés de formule I.

La voie de synthèse décrite dans la figure 1 illustre un mode de réalisation particulier du procédé selon l'invention. L'ester éthylique de l'acide imidazole-4-carboxylique fut 10 converti en son désoxynucléoside par action de la N-transdésoxyribosylase, utilisée sans purification sous forme d'un extrait protéique de *Lactobacillus leichmannii*, en prenant la thymidine comme source de désoxyribose. Après protection de l'alcool en 5' par un groupe diméthoxytrityle, le nucléoside portant la fonction ester éthylique fut à son tour converti en son dérivé carbohydrazide par action de l'hydrazine. La fonction 15 amine du groupe carbohydrazide fut ensuite protégée par condensation d'un groupe benzyloxycarbonyle. Après acétylation de l'alcool en 3' et libération de l'alcool en 5', le synthon obtenu fut soumis aux étapes de phosphorylation suivantes, à savoir : phosphorylation par le cyanoéthyl-phosphate en présence de dicyclohexylcarbodiimide ; libération concomitante en milieu basique de l'alcool 3' et du 5' phosphate ; 20 condensation de pyrophosphate au 5' phosphate activé sous forme de morpholidate. La production du synthon réactif désoxynucléoside triphosphate du carbohydrazide dX<sub>0</sub>TP fut achevée par hydrogénolyse du groupe benzyloxycarbonyle.

La condensation du carbohydrazide dX<sub>0</sub>TP avec Z1-CHO et Z1-CO-Z2 conduit aux 25 dérivés hydrazones dX<sub>1</sub>TP, puis aux composés dX<sub>2</sub>TP après réduction.

Un autre aspect de l'invention se rapporte aux composés susceptibles d'être obtenus à partir des procédés explicités ci-dessus et aux librairies de composés de formule générale I susceptibles d'être obtenues lorsqu'on fait réagir un ou plusieurs composés 30 de formule générale II avec une librairie d'aldéhydes et/ou de cétones.

L'invention concerne également un procédé d'identification de composés capables d'introduire une mutation dans un acide nucléique comprenant les étapes consistant à i) incorporer dans un oligonucléotide synthétique un composé de formule I dans lequel Y<sub>1</sub> est NH<sub>2</sub>, ii) faire réagir ledit composé par condensation avec au moins un aldéhyde 5 et/ou une cétone, éventuellement suivie d'une réduction, iii) répliquer ledit oligonucléotide à l'aide d'une polymérase et déterminer si une mutation a été introduite dans le brin nouvellement synthétisé.

Ainsi, dans un autre mode de réalisation, l'invention se rapporte à un procédé de 10 mutation ponctuelle d'un acide nucléique caractérisé en qu'on i) prépare un oligonucléotide synthétique comprenant au moins un composé selon l'invention, ii) on réplique ledit oligonucléotide à l'aide d'une polymérase.

Dans un autre alternative, l'invention vise un procédé de mutation aléatoire d'un acide nucléique comprenant les étapes consistant à utiliser un mélange réactionnel 15 comprenant au moins un composé précité pour l'amplification d'un acide nucléique.

Un tel procédé de mutagénèse aléatoire est particulièrement utile pour modifier l'activité d'un polypeptide d'intérêt.

Pour l'elongation, la réplication et l'amplification, on peut utiliser une ADN 20 polymérase exo- telle que par exemple la Taq polymérase, le fragment de klenow et la Vent polymérase.

Toutefois, il est possible d'utiliser des ADN pol exo+ dans le cas où l'on souhaite cribler des composés selon l'invention qui seraient résistants à l'activité exonucléasique. De tels composés sont particulièrement utiles dans les procédés de 25 détection de mutations.

Un aspect supplémentaire concerne un procédé d'identification d'un composé capable d'inhiber une enzyme sélectionnée parmi une polymérase, notamment une réverse transcriptase, et/ou une kinase, notamment toute kinase capable de phosphoryler les 30 nucléotides mono ou di-phosphate *in vivo* ou *in vitro* (désoxycytidine kinases, désoxyguanosine kinases et thymidine kinases) caractérisé en ce que l'on teste l'activité de ladite enzyme en présence d'au moins un composé selon l'invention.

Dans ce procédé, on peut tester l'effet d'au moins un desdits composés sur des cellules infectées par un rétrovirus, ledit composé se trouvant sous la forme d'un analogue de nucléoside. En effet, les nucléosides peuvent traverser la membrane des cellules, ce qui n'est pas le cas des nucléotides à cause de la charge négative des groupes phosphates.

- 5 On peut donc effectuer un criblage à grande échelle en utilisant une librairie selon l'invention et par un processus itératif avec des fractions de la librairie, on arrive par des expériences de routine à l'identification d'un ou plusieurs composé(s) bloquant la réPLICATION DES VIRUS.

L'invention vise les composés susceptibles d'être obtenus à partir du procédé précité.

10

Par ailleurs, les composés de l'invention peuvent être utilisés dans des amorces ou sondes pour l'amplification et/ou pour la détection d'un acide nucléique cible.

- Une « sonde » ou une « amorce » se définit, dans le sens de l'invention, comme étant un fragment nucléotidique comprenant par exemple de 10 à 100, notamment de 15 à 35  
15 nucléotides naturels ou modifiés, comprenant au moins un composé répondant à la formule I décrite ci-dessus et possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour former un complexe d'hybridation avec un acide nucléique cible. Les sondes selon l'invention, qu'elles soient spécifiques ou non-spécifiques, peuvent être immobilisées, directement ou indirectement, sur un support  
20 solide ; on parle alors de «sonde de capture». Par ailleurs, lesdites sondes peuvent porter un agent marqueur permettant leur détection ; on parle alors de « sonde de détection ».

- Une «sonde de capture» est immobilisée ou immobilisable sur un support solide par  
25 tout moyen approprié, par exemple par covalence, par adsorption ou par synthèse directe sur un support solide. Ces techniques sont notamment décrites dans la demande de brevet WO 92/10092. La méthode la plus générale consiste à immobiliser l'acide nucléique extrait des cellules de différents tissus ou de cellules en culture sur un support (tels que la nitrocellulose, le nylon<sup>TM</sup>, le polystyrène) et à incuber, dans des  
30 conditions bien définies, l'acide nucléique cible immobilisé avec la sonde. Après l'hybridation, l'excès de sonde est éliminé et les molécules hybrides formées sont

détectées par la méthode appropriée (mesure de la radioactivité, de la fluorescence ou de l'activité enzymatique liée à la sonde).

Une « sonde de détection » peut être marquée au moyen d'un marqueur choisi par exemple parmi les isotopes radioactifs, des enzymes, en particulier des enzymes susceptibles d'agir sur un substrat chromogène, fluorogène ou luminescent (notamment une peroxydase ou une phosphatase alcaline), des composés chimiques chromophores, des composés chromogènes, fluorogènes ou luminescents, des analogues de base nucléotidiques, et des ligands tels que la biotine. Le marquage des amorces ou des sondes obtenues selon l'invention est réalisé par des éléments radioactifs ou par des molécules non radioactives. Les entités non radioactives sont sélectionnées parmi les ligands tels la biotine, l'avidine, la streptavidine, la dioxygénine, les haptènes, les colorants, les agents luminescents tels que les agents radioluminescents, chémiluminescents, bioluminescents, fluorescents (fluorescéine isothiocyanate FITC, R-phycoérythrine PE, Quantum Red<sup>TM</sup>, SIGMA et fluorescamine, Molecular Bioprobes) et phosphorescents.

Dans un mode de réalisation particulier, l'invention porte sur les composés de formule I marqués. Comme indiqué précédemment, on peut condenser un composé de formule II avec une molécule comportant une fonction aldéhyde ou cétone. Dans ce cas, lesdites molécules portent un marqueur du type chromophores, composés chromogènes, fluorogènes ou luminescents ou ligands tels que la biotine.

Les acides nucléiques comportant au moins un composé de formule I sont visés par la présente invention. Ils peuvent être mis en oeuvre dans les techniques du type PCR (Erlich, 1989 ; Innis et al., 1990, et Rolfs et al., 1991). Cette technique nécessite le choix de paires d'amorces oligonucléotidiques encadrant le fragment qui doit être amplifié. On peut, par exemple, se référer à la technique décrite dans le brevet américain U.S. N° 4,683,202. D'autres techniques d'amplification peuvent être avantageusement employées comme alternative à la PCR (PCR-like) à l'aide de couple d'amorces selon l'invention. Par PCR-like on entendra désigner toutes les méthodes mettant en oeuvre des reproductions directes ou indirectes des séquences d'acides

nucléiques, ou bien dans lesquelles les systèmes de marquage ont été amplifiés, ces techniques sont bien connues de l'homme du métier.

L'invention concerne également un kit pour l'amplification et/ou la détection d'un acide nucléique cible et une composition pharmaceutique comprenant un composé selon l'invention ou un acide nucléique selon l'invention. Elle porte également sur l'utilisation d'un acide nucléique décrit ci-dessus comme ribozyme. On entend par « ribozyme » dans le sens de l'invention, un acide nucléique, un dérivé d'acide nucléique ou un hybride chimique entre acide nucléique et peptide qui présente des propriétés catalytiques, de modulation de l'activité ou de l'expression d'une protéine, d'un polypeptide, d'un peptide ou d'un gène. Un acide nucléique selon l'invention peut donc se substituer à un enzyme.

Dans un autre aspect, l'invention se rapporte à des oligonucléotides antisens comprenant au moins un composé de formule I. Par antisens, on entend désigner un oligonucléotide complémentaire d'un ADN ou ARN cible bloquant la transcription ou la traduction. Des exemples d'application sont donnés notamment dans WO9954463, WO9838204, WO9829448, WO9735960, WO9710840 et WO9625497.

Dès lors, ledit acide nucléique selon l'invention est utile comme médicament et dans des méthodes de traitement.

L'invention porte également sur l'utilisation d'un composé décrit précédemment pour la fabrication d'un médicament, notamment pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement des infections rétrovirales et du cancer.

25

**Exemple 1 : Procédé de préparation de composés préférés selon l'invention (figure 1).**

La synthèse du triphosphate 1 implique l'introduction d'un groupe temporaire de protection sur la fonction hydrazine qui peut être libérée dans des conditions neutres. A cet effet, on a sélectionné le groupe benzyloxycarbonyle. La chaîne triphosphate a été introduite en 3 étapes, conformément aux procédures décrites par Tener et Moffatt. Le nucléoside 3 a été obtenu à partir du composé 2 par transglycosylation enzymatique en

utilisant la N-désoxyribosyltransferase comme décrit précédemment par Pochet et al. 1995.

La 5'-dimethoxytritylation du composé 3 dans la pyridine a permis l'obtention du composé 4 avec un rendement de 73 %. Le traitement du composé 4 avec un large 5 excès d'hydrate d'hydrazine à 60° C a conduit au composé 5 qui peut être utilisé dans les étapes suivantes sans purification supplémentaire.

Le groupe benzyloxycarbonyle a été introduit en faisant réagir le composé 5 avec le benzyloxycarbonylsuccinimidate conduisant au composé 6 en un rendement de 81 %.

L'acylation avec l'anhydride acétique dans la pyridine produit un mélange de deux 10 composés majeurs correspondant au composé 3'-O-acétylé 7 (24 %) et au composé 3'-O, N-diacétylé 8 (38 %). L'acétylation complète a été rapidement obtenue dans l'acetonitrile en utilisant l'anhydride acétique (2.2 eq.) en présence de triéthylamine catalysée par le DMAP permettant d'obtenir le composé 8 avec un rendement de 80 %. Après détritylation du composé 8, la condensation du composé 9 avec le 15 cyanoéthylphosphate dans la pyridine en présence de DCC, suivie par un traitement avec une solution de 2 % de méthylate de sodium dans le méthanol, le procédé a conduit au composé 5'monophosphate 11 (52 %). Le composé triphosphate 13 a été obtenu en deux étapes en passant par le composé morpholidate 12 avec un rendement de 50 %. La suppression du groupe protecteur benzyloxycarbonyle a été accomplie par 20 hydrogénolyse sur Pd/C en présence de H<sub>2</sub>. Ainsi, le traitement des composés 11 et 13 a permis d'obtenir les dérivés monophosphate 14 et triphosphate 1.

**Exemple 2 : Condensation du composé 1 avec des aldéhydes.**

La dérivatisation de la fonction hydrazine a été effectuée en utilisant des aldéhydes 25 aromatiques et aliphatiques : premièrement, le composé monophosphate 14 a été traité avec le 3-méthylthiopropionaldéhyde et le benzaldéhyde dans H<sub>2</sub>O/méthanol pour donner les composés 15a et 15b. Ces produits ont été isolés par HPLC en phase inverse et ont été caractérisés par la technique de spectrométrie de masse et par RMN. De la même manière, le composé 1 dans le tampon TEAA (pH 7,5) a été traité à 30 4°C avec un excès d'aldéhydes dans du méthanol pour donner les composés 16a et 16b. La structure des dérivés triphosphates a été confirmée par spectrométrie de masse.

On a rajouté au composé 1 dans 0,2 ml de 0,1M TEAA un aldéhyde (25 $\mu$ L dans 0,1 mL de méthanol). Après 2 heures, la solution a été concentrée et purifiée par HPLC à  $\lambda=230$  nm (0 à 25% acétronitrile dans 10 mM TEAA). Les fractions contenant le produit pur ont été lyophilisées et passées à travers une colonne échangeuse de cations 5 (Dowex) pour donner les triphosphates sous la forme de sels de sodium.

**Exemple 3 : Incorporation des analogues dX<sub>0</sub>TP et dX<sub>1</sub>TP dans les acides nucléiques.**

Les analogues (dX<sub>0</sub>TP, dX<sub>1</sub>TP(a) et dX<sub>1</sub>TP(b)) ont été soumis à des expériences 10 d'elongation d'amorce catalysées par le fragment de Klenow exo-. Une amorce a été marquée à son extrémité 5' par réaction d'un [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP utilisant la T4 polynucléotide kinase. Les matrices appropriées et les amorces marquées ont été incubées à 75°C pendant 15 minutes, puis refroidies lentement à température ambiante pendant 1 heure. Dans différents mélanges réactionnels, on a réalisé l'elongation de l'amorce avec une 15 ADN polymérase en présence des dX<sub>1</sub>TP donnés. Les échantillons ont ensuite été dénaturés puis chargés sur un gel de polyacrylamide (20% 7M d'urée). Après électrophorèse, les gels ont été visualisés par autoradiographie ou à l'aide d'un Phosphorimager<sup>TM</sup>.

**Références**

- Bergstrom D.E., Zhang P., Toma P.H., Andrews P.C. & Nichols R. (1995) "Synthesis, 5 structure, and deoxyribonucleic acid sequencing with a universal nucleoside: 1-(2'-deoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-3-nitropyrrole" *J. Am. Chem. Soc.* 117, 1201-1209.
- Hill F., Loakes D. & Brown D.M. (1998) "Polymerase recognition of synthetic oligonucleotides incorporating degenerate pyrimidine and purine bases" *Proc. Nat. 10 Acad. Sci.*, 95, 4258-4263.
- Hutchinson D.W. (1990) *TIBTECH*, 8, 348-353.
- Le Bec C., Roux P., Buc H. & Pochet S. (1997) Derivatives of imidazole-4-carboxamide as substrates for various DNA polymerases. *Nucleosides & Nucleotides* 15 16 (7-9), 1301-1302.
- Loakes D., Brown D.M., Linde S. & Hill F. (1995) "3-Nitropyrrole and 5-nitroindole as universal bases in primers for DNA sequencing and PCR" *Nucleic Acids Research* 20 23, 2361-2366.
- Pochet S., Dugué L., Meier A. & Marlière P. (1995) "Enzymatic synthesis of 1-(2'-deoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-imidazole-4-carboxamide, a simplified DNA building block" *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 5, 1679-1684.
- Pochet S., Dugué L., Sala M., Pezo V. & Wain-Hobson S. (1997) "Ambiguous base pairing of the purine analogue 1-(2-deoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-imidazole-4-carboxamide during PCR" *Nucleosides & Nucleotides* 16 (7-9), 1749-1752.
- Pochet S. & Dugué L. (1998) "Imidazole-4-carboxamide and triazole-4-carboxamide deoxynucleosides as simplified DNA building-blocks with ambiguous base pairing capacity" *Nucleosides & Nucleotides* 17(9-11), 2003-2009.

Sala M., Pezo V., Pochet S. & Wain-Hobson S. (1996) "Ambiguous base pairing of the purine analogue 1-(2-deoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-imidazole-4-carboxamide during PCR" Nucleic Acids Research 24, 3302-3306.

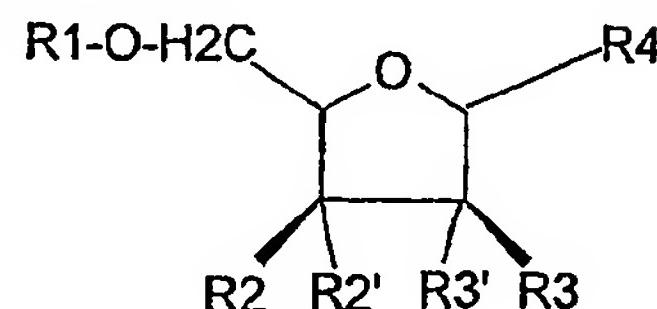
5

Zaccolo M., Williams D.M., Brown D.M. & Gherardi E. (1996) "An approach to random mutagenesis of DNA using mixtures of triphosphate derivatives of analogues" J. Mol. Biol. 255, 589-603.

## **REVENDICATIONS**

## 1. Composés de formule générale I :

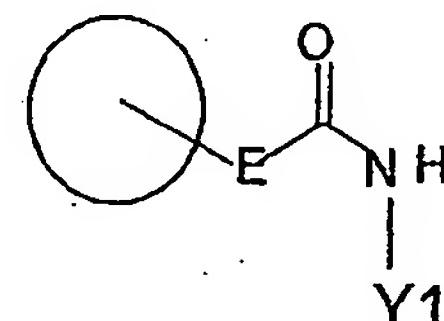
5



10 dans laquelle :

- le groupe R1 représente un hydrogène ou un groupe choisi parmi les groupes phosphate, diphosphate ou triphosphate et les groupes protecteurs tels que DMT.
  - R2 et R2' sont choisis indépendamment l'un de l'autre parmi H, OH, le phosphoramidite et ses dérivés, le H-phosphonate et un terminateur d'elongation T,
  - R3 et R3' sont choisis indépendamment l'un de l'autre parmi H, OH, les halogènes (F, Br, Cl, I), un groupe alkyle linéaire ou ramifié comportant 1 à 6 atomes de carbone et un groupe O-R5, R5 représentant un groupe alkyle linéaire ou ramifié comportant 1 à 6 atomes de carbone,
  - R4 représente un hétérocycle (symbolisé par un cercle) substitué, de formule

20

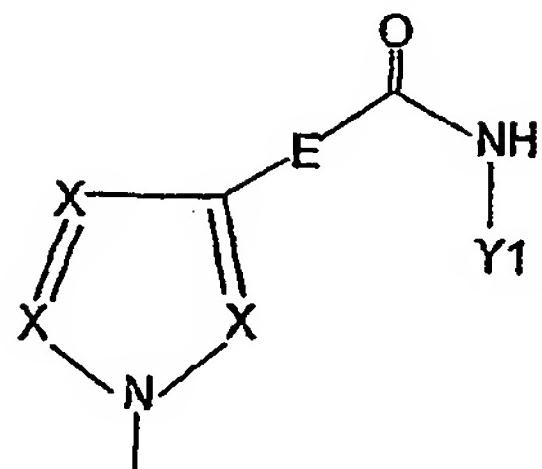


25

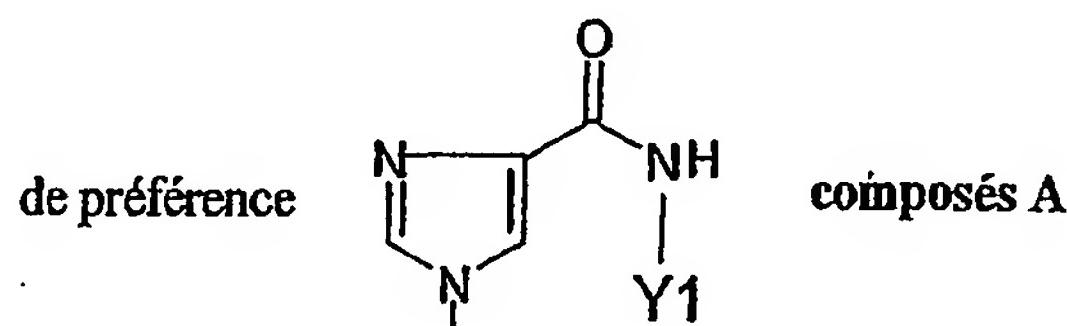
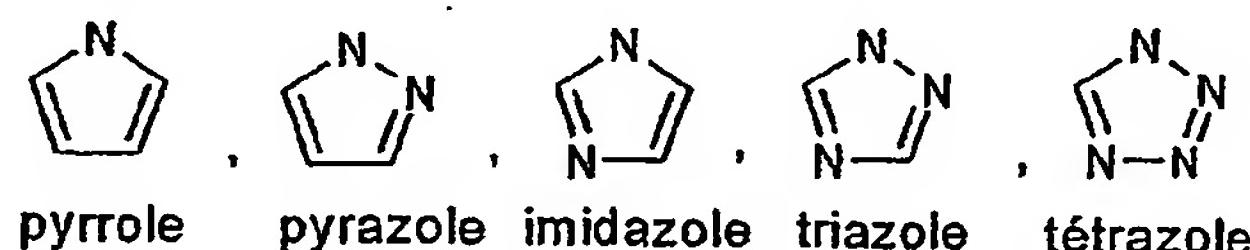
dans lesquelles E désigne un bras espaceur constitué par une chaîne carbonée de 0 à 20 atomes de carbones saturée ou non, comprenant ou non des hétéroatommes et/ou éventuellement substitué ; ledit hétérocycle étant sélectionné parmi :

20

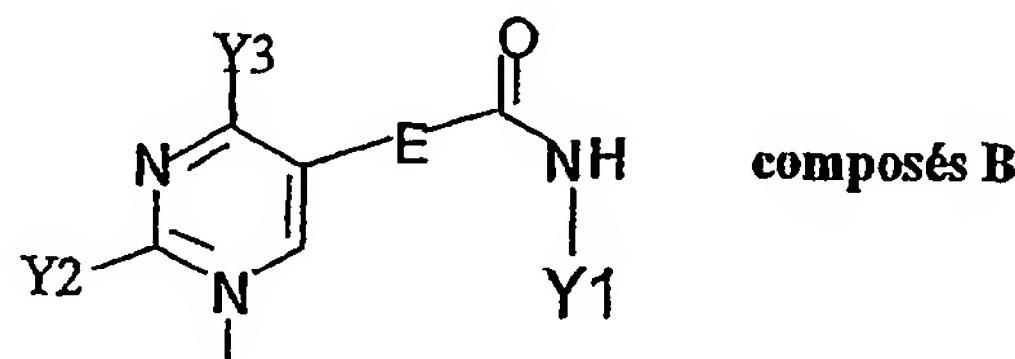
a) les hétérocycles à 5 atomes de la formule :



dans laquelle X représente indépendamment les un des autres un groupe CH, C-R<sub>6</sub>, ou N, R<sub>6</sub> étant choisi parmi les halogènes (F, Br, Cl, I), un groupe alkyle linéaire ou ramifié comportant 1 à 6 atomes de carbone et un groupe O-R<sub>7</sub> ou S-R<sub>7</sub>, R<sub>7</sub> représentant un hydrogène ou un groupe alkyle linéaire ou ramifié comportant 1 à 6 atomes de carbone, lesdits hétérocycles appartenant notamment à la famille des azoles,  
5 tels que les cycles



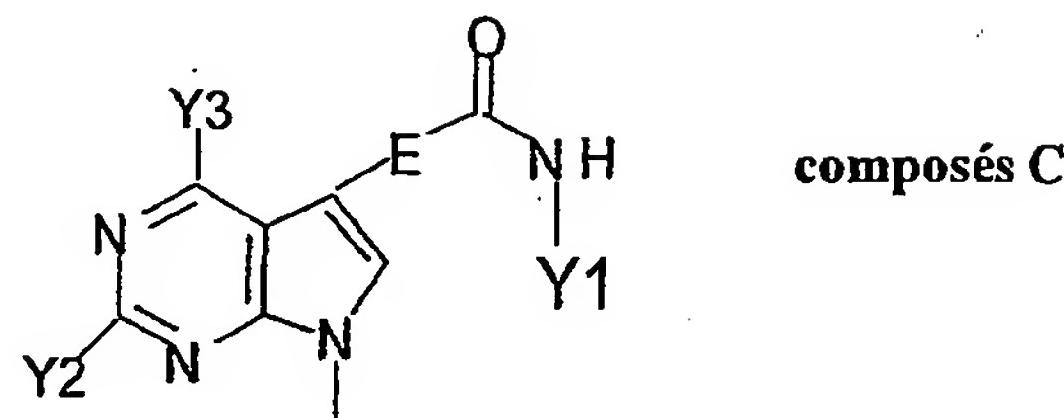
10 b) les cycles à 6 atomes, notamment les pyrimidines de formule :



15

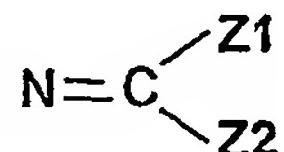
c) les analogues de purines de formule :

5

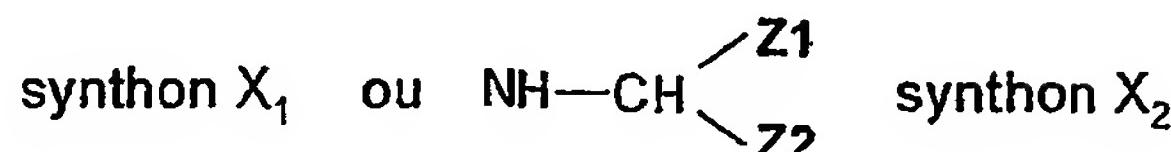


dans lesquels :

- Y1 représente NH<sub>2</sub> (désigné par le synthon X<sub>0</sub>) ou un groupe :



10



- Y2 et Y3 sont choisis indépendamment l'un de l'autre parmi H, OH, O, NH<sub>2</sub>, les halogènes (F, Br, Cl, I), SCH<sub>3</sub>, SH, une amine, un amide (dans le sens —NH-CO-R) ou un alkyle linéaire (sens —OR) ou ramifié comportant 1 à 6 atomes de carbone,  
 Z1 et Z2 étant choisis indépendamment l'un de l'autre parmi H et un groupe  
 15 organique.

2. Composés selon la revendication 1 caractérisés en ce que le groupe R1 est un groupe triphosphate.

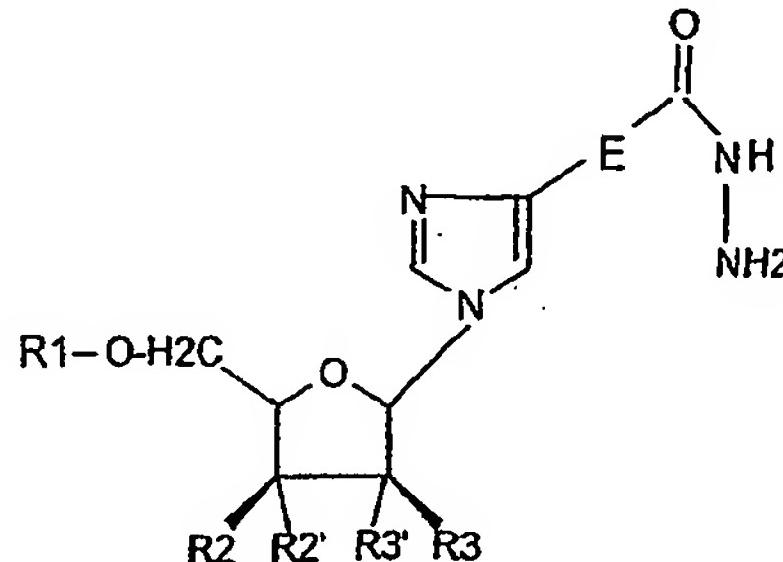
20 3. Composés selon l'une des revendications 1 à 2 caractérisés en ce qu'au moins un des groupes R2 et R2' représente un groupe OH.

4. Composés selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisés en ce que T est sélectionné de préférence parmi F, Br, Cl, I, N<sub>3</sub>, et un groupe alkyle linéaire ou ramifié

25 comportant 1 à 6 atomes de carbone.

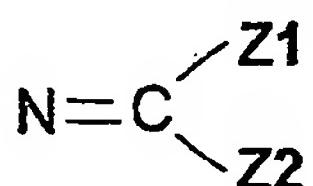
5. Composés selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisés en ce que Y1 est NH<sub>2</sub> correspondant aux synthons de formule générale II (synthon X<sub>0</sub>) :

5



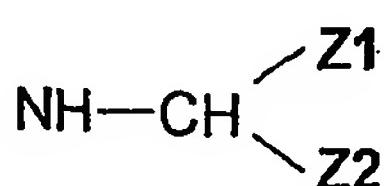
10 dans lesquels R1, R2, R2', R3, R3' et E correspondent aux groupes de la formule I.

6. Composés selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisés en ce que Y1 représente un groupe choisis parmi le groupe :



15 Z1 et Z2 représentant indépendamment l'un de l'autre un hydrogène ou un groupe organique (synthons X<sub>1</sub> et X<sub>1</sub>TP).

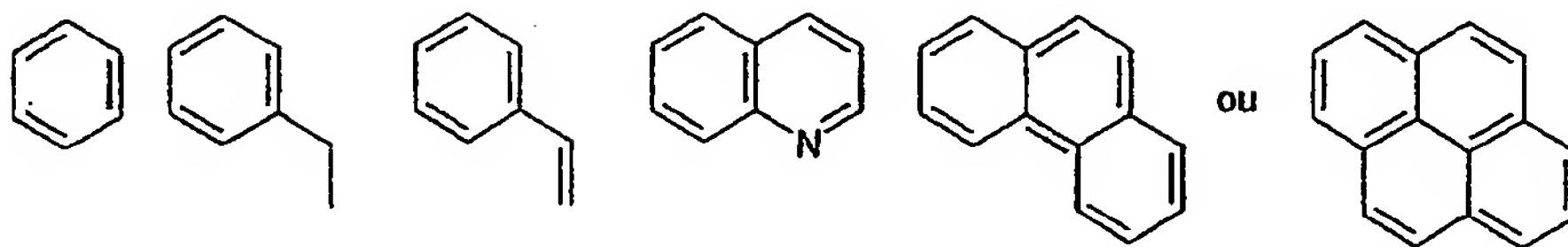
7. Composés selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisés en ce que Y1 représente un groupe choisi parmi le groupe :



20 Z1 et Z2 représentant indépendamment l'un de l'autre un hydrogène ou un groupe organique (synthons X<sub>2</sub> et X<sub>2</sub>TP).

8. Composés selon l'une des revendications 6 et 7 caractérisés en ce qu'au moins un des groupes Z1 et Z2 est sélectionné parmi les groupes aromatiques, notamment parmi

25 les groupes de formule :



9. Composés selon l'une des revendications 6 et 7 caractérisés en ce qu'au moins un des groupes Z1 et Z2 est sélectionné parmi les groupes thiol, alkyle, carbonyle, amine, alcool, aryle, et acide aminé.

5

10. Composés selon l'une des revendications 6 et 7 caractérisés en ce que Z1 ou Z2 forme un cycle avec Y3.

11. Composés selon l'une des revendications 6 et 7 caractérisés en ce que Z1 ou Z2

10 comprend un marqueur fluorescent ou phosphorescent, notamment la fluorescamine.

12. Composés selon l'une des revendications précédentes caractérisés en ce qu'ils sont substrats d'une polymérase, d'une réverse transcriptase et/ou d'une nucléotide kinase.

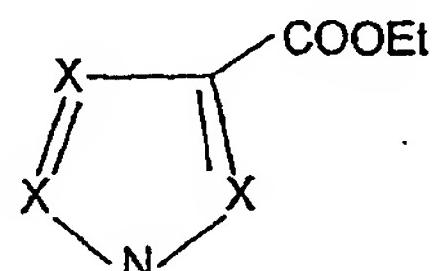
15 13. Composés selon l'une des revendications précédentes caractérisés en ce qu'ils forment des appariements avec les bases naturelles.

14. Composés selon la revendication 12 caractérisés en ce qu'ils inhibent une polymérase, notamment une réverse transcriptase de rétrovirus et/ou une kinase.

20

15. Procédé de préparation de composés de formule générale II selon la revendication 5 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

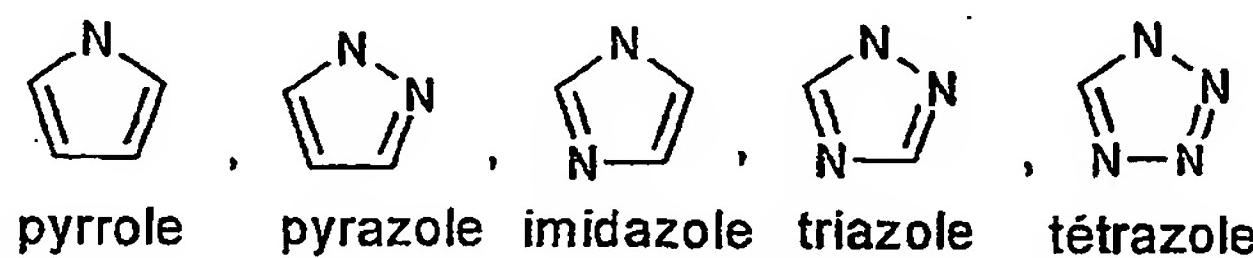
a) préparation du nucléoside ayant pour hétérocycle un hétérocycle à 5 atomes de formule :



25

dans laquelle X représente indépendamment les un des autres un groupe CH, C-R6, ou N, R6 étant choisi parmi les halogènes (F, Br, Cl, I), un groupe alkyle linéaire ou ramifié comportant 1 à 6 atomes de carbone et un groupe O-R7 ou S-R7, R7 représentant un hydrogène ou un groupe alkyle linéaire ou ramifié comportant 1 à 6 atomes de carbone, lesdits hétérocycles appartenant notamment à la famille des azoles,

- 5 tels que les cycles



b) protection de l'alcool en 5' et transformation de la fonction ester éthylique en fonction carbohydrazide par l'action de l'hydrazine,

- 10 c) protection de la fonction amine du groupe carbohydrazide par un groupe protecteur tel que le groupe benzyloxycarbonyle, acétylation de l'alcool en 3',  
d) phosphorylation après déprotection de l'alcool en 5',  
e) et hydrogénolyse du groupe benzyloxycarbonyle.

- 15 16. Procédé de préparation selon la revendication 15 caractérisé en ce que l'étape a) est réalisée au moyen d'une N-transdésoxyribosylase.

17. Procédé de préparation selon l'une des revendications 15 et 16 caractérisé en ce que l'étape d) consiste en la phosphorylation du nucléoside par le cyanoéthyl-phosphate en présence de dicyclohexylcarbodiimide; libération concomitante en milieu basique de l'alcool 3' et du groupe cyanoéthyle du 5' phosphate; puis condensation de pyrophosphate au 5' phosphate activé sous forme de morpholidate.

18. Procédé de préparation d'un composé de formule générale I selon l'une des 25 revendications 6 à 11 caractérisé en ce qu'un composé de formule générale II selon la revendication 5 est condensé avec un aldéhyde ou une cétone.

19. Procédé selon la revendication 18 caractérisé en ce que l'on fait réagir un ou plusieurs composé(s) de formule générale II selon la revendication 5 avec une librairie d'aldéhydes et/ou de cétones, suivi éventuellement d'une réduction.
- 5 20. Composés susceptibles d'être obtenus à partir d'un procédé selon l'une des revendications 15 à 19.
21. Librairies de composés de formule générale I selon l'une des revendications 1 à 11 susceptibles d'être obtenues à partir du procédé selon la revendication 19.
- 10 22. Procédé d'identification de composés capables d'introduire une mutation dans un acide nucléique comprenant les étapes consistant à i) incorporer dans un oligonucléotide synthétique un composé selon la revendication 1 dans lequel Y1 est un groupe NH<sub>2</sub>, ii) faire réagir ledit composé conformément au procédé selon la revendication 18 ou 19, éventuellement suivi d'une réduction, iii) répliquer ledit oligonucléotide à l'aide d'une polymérase et déterminer si une mutation a été introduite dans le brin nouvellement synthétisé.
- 15 23. Procédé de mutation ponctuelle d'un acide nucléique caractérisé en ce qu'on i) prépare un oligonucléotide synthétique comprenant au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 11, ii) on réplique ledit oligonucléotide à l'aide d'une polymérase.
- 20 24. Procédé de mutation aléatoire d'un acide nucléique comprenant les étapes consistant à utiliser un mélange réactionnel comprenant au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 11 pour l'amplification d'un acide nucléique.
- 25 25. Procédé selon l'une des revendications 22 à 24 caractérisé en ce qu'on utilise une ADN polymérase exo-.
- 30 26. Procédé d'identification d'un composé capable d'inhiber une enzyme sélectionnée parmi une polymérase, notamment une réverse transcriptase et une kinase, caractérisé

en ce que l'on test l'activité de ladite enzyme en présence d'au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 11.

27. Procédé d'identification d'un composé capable d'inhiber une réverse transcriptase  
5 d'un rétrovirus caractérisé en ce que l'on test l'effet d'au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 11 sur des cellules infectées par un rétrovirus, ledit composé se trouvant sous la forme d'un analogue de nucléoside.
28. Procédé selon l'une des revendications 23 à 27 caractérisé en ce qu'on utilise une  
10 librairie selon la revendication 21.
29. Acide nucléique comportant au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 11.
- 15 30. Utilisation d'un composé selon l'une des revendications 1 à 11 dans un procédé de mutagénèse aléatoire.
31. Utilisation d'un composé selon l'une des revendications 1 à 11 comme base ambiguë.  
20
32. Utilisation d'un composé selon l'une des revendications 1 à 11 dans une amorce ou une sonde pour l'amplification et/ou la détection d'un acide nucléique cible.
33. Utilisation selon la revendication 32 caractérisée en ce que ledit composé est  
25 marqué.
34. Kit pour l'amplification et/ou la détection d'un acide nucléique cible comprenant un composé selon l'une des revendications 1 à 11 ou un acide nucléique selon la revendication 29.  
30
35. Utilisation d'un acide nucléique selon la revendication 29 pour la préparation d'un médicament.

36. Utilisation d'un acide nucléique selon la revendication 29 comme ribozyme pour la préparation d'un médicament.

5 37. Utilisation d'un acide nucléique selon la revendication 29 comme antisens pour la préparation d'un médicament.

38. Utilisation d'un composé selon l'une des revendications 1 à 5 dans lequel Y1 est NH<sub>2</sub> comme synthon de départ pour la préparation de librairie d'analogues de  
10 nucléotides et/ou de nucléosides.

39. Utilisation d'un composé selon l'une des revendications 1 à 11 pour la fabrication d'un médicament.

15 40. Utilisation selon la revendication 39 pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement des infections rétrovirales.

41. Utilisation selon la revendication 39 pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement du cancer.

1 / 2

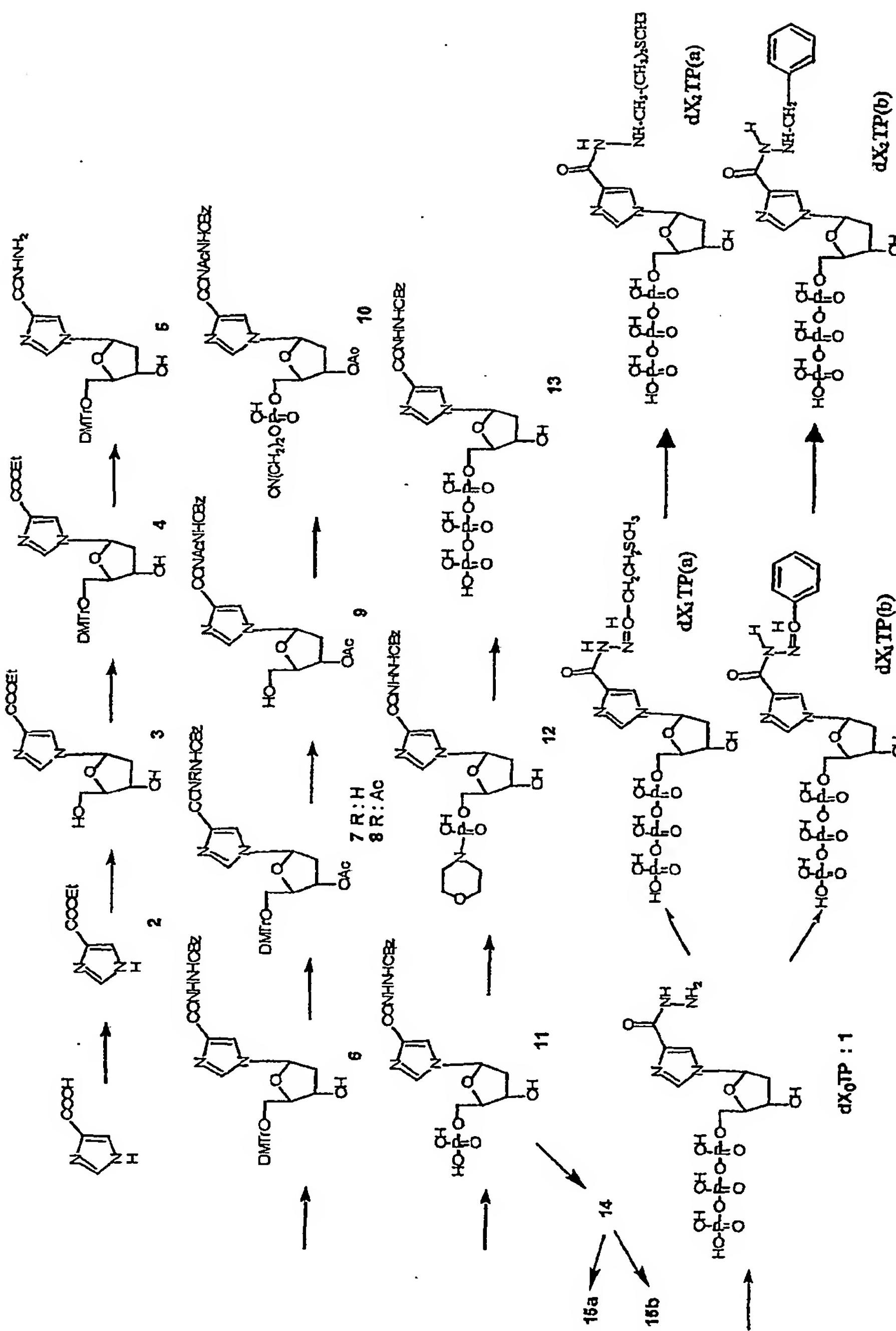
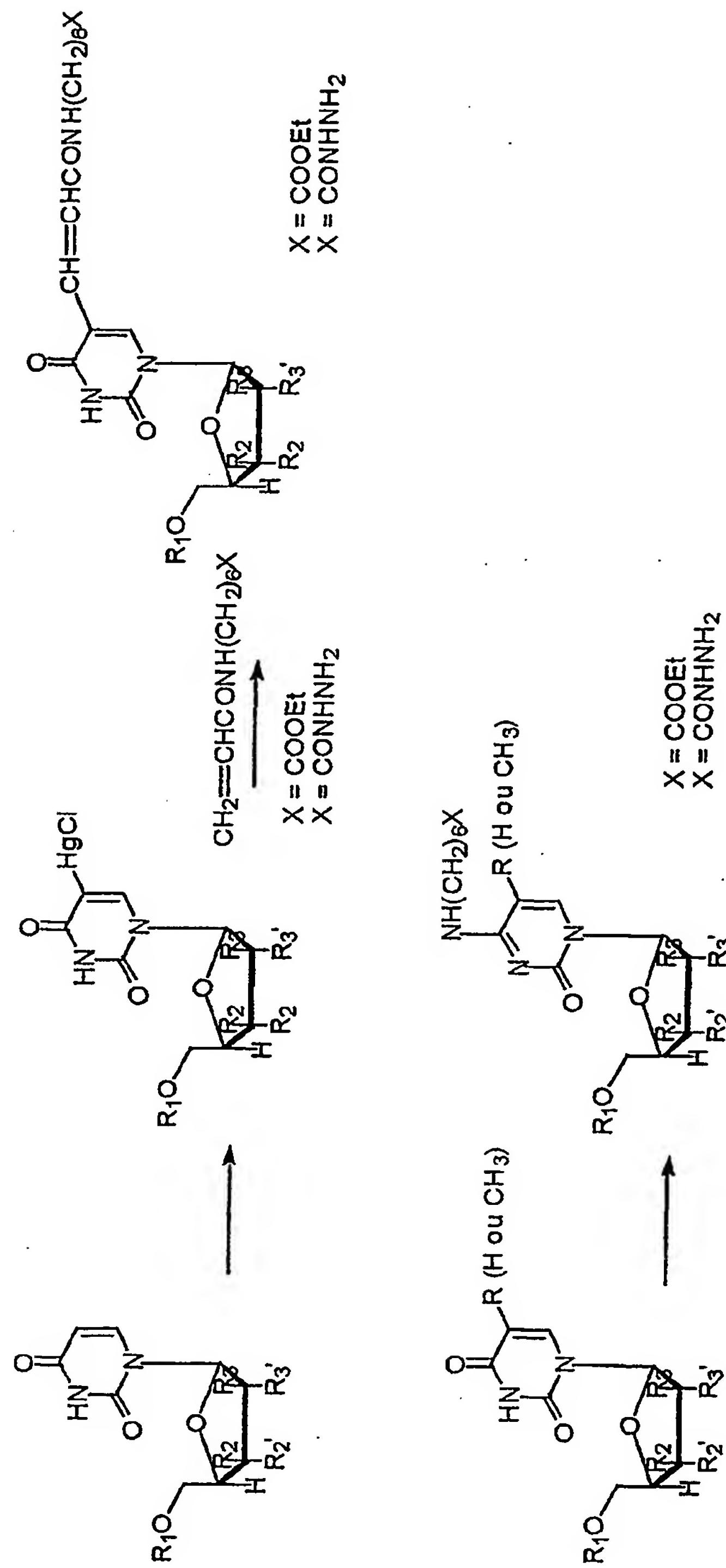


FIGURE 1



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 01/01830

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER					
IPC 7	C07H19/044	C07H19/052	C07H19/056	C07H19/06	C07H19/16
	C07H21/00	C12Q1/68	G01N33/53	A61K31/7052	A61P31/12
	A61P35/00				

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07H C12Q G01N A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J.T. WITKOWSKI ET AL.: "Design, synthesis, and broad spectrum antiviral activity of 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,3-triazole-3-carboxamide and related nucleosides" J. MED. CHEM., vol. 15, 1972, pages 1150-1154, XP002164810 the whole document	1,3, 12-14,40
X	M. T. GARCIA-LOPEZ, R. HERRANZ: "Studies on new routes for the synthesis of 4- and 5-aminoimidazole nucleoside derivatives" J. HETERO CYCLIC CHEM., vol. 19, 1982, pages 233-235, XP002164811 page 233, right-hand column	1,3,5, 12-14

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

Date of mailing of the International search report

25 September 2001

04/10/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

de Nooy, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 01/01830
---

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 106, no. 13, 1987            Columbus, Ohio, US;            abstract no. 95702z,            T.P. NEDOREZOVA ET AL.: "Effects of 4,5-disubstituted 1,2,3-triazoles and their N2-ribosides on pyrimidine precursors incorporation into nucleic acids of tumor cells"            page 30; column r;            XP002164815            abstract            &amp; KHIM.-FARM. ZH., vol. 20, 1986, pages 1299-1302,</p>	1,3, 12-14,41
X	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 108, no. 1, 1988            Columbus, Ohio, US;            abstract no. 6331d,            I.D. SHINGAROVA ET AL.: "Nucleosides of 4-(methylthio)-1,2,3-triazole-5-carboxylic acid derivatives"            page 605; column 1;            XP002164816            abstract            &amp; KHIM. GETEROTSIKL. SOEDIN., 1987, pages 231-235,</p>	1,3, 12-14
X	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 108, no. 21, 1988            Columbus, Ohio, US;            abstract no. 187169a,            I.D. SHINGAROVA ET AL.: "Position of glycosidation of 5-substituted 4-chloro-1,2,3-triazoles"            page 750; column r;            XP002164817            abstract            &amp; KHIM. GETEROTSIKL. SOEDIN., 1987, pages 937-940,</p>	1,3, 12-14
A	<p>C. LE BEC ET AL.: "Derivatives of imidazole-4-carboxamide as substrates for various DNA polymerases"            NUCLEOSIDES &amp; NUCLEOTIDES, vol. 16, 1997, pages 1301-1302,            XP002164812            cited in the application            the whole document</p>	2,12,16
		-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/01830

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	S. POCHET, L. DUGUÉ: "Imidazole-4-carboxamide and 1,2,4-triazole-3-carboxamide deoxynucleotides as simplified DNA building blocks with ambiguous pairing capacity" NUCLEOSIDES & NUCLEOTIDES, vol. 17, 1998, pages 2003-2009, XP002164813 cited in the application the whole document —	16,29
A	M. SALA ET AL.: "Ambiguous base pairing of the purine analogue 1-(2-deoxy-beta-D-ribofuranosyl)-imidazol e-4-carboxamide during PCR" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 24, 1996, pages 3302-3306, XP002164814 cited in the application the whole document —	21,22

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale N°

PCT/FR 01/01830

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**

CIB 7	C07H19/044	C07H19/052	C07H19/056	C07H19/06	C07H19/16
	C07H21/00	C12Q1/68	G01N33/53	A61K31/7052	A61P31/12
				A61P35/00	

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 7 C07H C12Q G01N A61K A61P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

**C. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS**

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	J.T. WITKOWSKI ET AL.: "Design, synthesis, and broad spectrum antiviral activity of 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,3-triazole-3-carboxamide and related nucleosides" J. MED. CHEM., vol. 15, 1972, pages 1150-1154, XP002164810 Le document en entier —	1,3, 12-14,40
X	M. T. GARCIA-LOPEZ, R. HERRANZ: "Studies on new routes for the synthesis of 4- and 5-aminoimidazole nucleoside derivatives" J. HETEROCYCLIC CHEM., vol. 19, 1982, pages 233-235, XP002164811 page 233, colonne de droite — —/—	1,3,5, 12-14

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (elle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

25 septembre 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

04/10/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patenttaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

de Nooy, A

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 01/01830

C(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 106, no. 13, 1987 Columbus, Ohio, US; abstract no. 95702z, T.P. NEDOREZOVA ET AL.: "Effects of 4,5-disubstituted 1,2,3-triazoles and their N2-ribosides on pyrimidine precursors incorporation into nucleic acids of tumor cells" page 30; colonne r; XP002164815 abrégé & KHIM.-FARM. ZH., vol. 20, 1986, pages 1299-1302,	1,3, 12-14,41
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 108, no. 1, 1988 Columbus, Ohio, US; abstract no. 6331d, I.D. SHINGAROVA ET AL.: "Nucleosides of 4-(methylthio)-1,2,3-triazole-5-carboxylic acid derivatives" page 605; colonne 1; XP002164816 abrégé & KHIM. GETEROTSIKL. SOEDIN., 1987, pages 231-235,	1,3, 12-14
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 108, no. 21, 1988 Columbus, Ohio, US; abstract no. 187169a, I.D. SHINGAROVA ET AL.: "Position of glycosidation of 5-substituted 4-chloro-1,2,3-triazoles" page 750; colonne r; XP002164817 abrégé & KHIM. GETEROTSIKL. SOEDIN., 1987, pages 937-940,	1,3, 12-14
A	C. LE BEC ET AL.: "Derivatives of imidazole-4-carboxamide as substrates for various DNA polymerases" NUCLEOSIDES & NUCLEOTIDES, vol. 16, 1997, pages 1301-1302, XP002164812 cité dans la demande le document en entier	2,12,16
		-/-

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale N°

PCT/FR 01/01830

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS	
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents no. des revendications visées
A	S. POCHET, L. DUGUÉ: "Imidazole-4-carboxamide and 1,2,4-triazole-3-carboxamide deoxynucleotides as simplified DNA building blocks with ambiguous pairing capacity" NUCLEOSIDES & NUCLEOTIDES, vol. 17, 1998, pages 2003-2009, XP002164813 cité dans la demande le document en entier —
A	M. SALA ET AL.: "Ambiguous base pairing of the purine analogue 1-(2-deoxy-beta-D-ribofuranosyl)-imidazol e-4-carboxamide during PCR" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 24, 1996, pages 3302-3306, XP002164814 cité dans la demande le document en entier —